

БИОФИЗИКА

УДК 577.113.6

Ս. Օ. Варdevանյան, Ա. Ս. Անտոնյան, Գ. Տ. Տարկիսյան, Տ. Գ. Արուտյոնյան

Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК в присутствии  
cis-DDP

(Представлено чл.-кор. НАН РА Э.С. Геворкяном 6/VI 2008)

**Ключевые слова:** *комплексы ДНК-cis-DDP-БЭ, температура плавления, ширина интервала плавления*

Определение стабилизирующего или дестабилизирующего действия различных низкомолекулярных соединений на нативную (двухцепочечную) структуру ДНК имеет большое значение, поскольку ДНК может менять свою структуру и в некоторых случаях из двухцепочечного (дц) переходить в одноцепочечное (оц) состояние [1,2]. ДНК в клетке окружена различными молекулами и в процессе реализации биологических функций образует с этими соединениями различные комплексы [1-5]. Низкомолекулярные соединения с ДНК связываются ковалентным или нековалентным способами. Несмотря на различия в способах связывания лигандов, интегральный результат — стабилизация дц- или оц-структуры ДНК может быть схожа. В частности, ковалентно связывающееся соединение *cis*-дихлордиаминплатина (*cis*-DDP), являющееся также противоопухолевым препаратом, при низких концентрациях стабилизирует дц-структуру ДНК [6-10]. Аналогичное влияние имеет нековалентно связывающееся соединение бромистый этидий (БЭ) [5].

Известно, что при низких концентрациях *cis*-DDP образует ковалентные сшивки с гуаниновыми основаниями ДНК, удаленными друг от друга на несколько сот оснований вдоль макромолекулы, что может приводить к образованию псевдокольцевых структур в ДНК [11]. Возможно также образование сшивок между отдельными молекулами ДНК (межмолекулярные сшивки) [7,8]. Следствием этого является подавление репликации и транскрипции ДНК, чем и обусловлена цитотоксичность *cis*-DDP [11-13]. БЭ же при

низких концентрациях интеркалирует в плоскость между парами оснований ДНК, вследствие чего возникает дополнительное стэкинг-взаимодействие, что приводит к стабилизации дц-структуры. Этот лиганд является антибактериальным, а также мутагенным веществом (т.е. обладает определенной цитотоксичностью) [5].

Известные в настоящее время исследования относятся к отдельному взаимодействию того или иного лиганда с ДНК, в то время как совместное связывание различных соединений с ДНК практически мало изучено. С этой точки зрения определенный интерес представляет исследование совместного связывания *cis*-DDP и БЭ с ДНК. Целью данной работы явилось исследование плавления комплексов ДНК-*cis*-DDP-БЭ и определение параметров - температуры ( $T_m$ ) и ширины интервала плавления ( $\Delta T$ ) двойных комплексов.

В работе были использованы ДНК тимуса теленка фирмы "Sigma" (США), БЭ, "Serva" (Германия), *cis*-DDP (Sigma Chem. Comp., США), NaCl, NaClO<sub>4</sub> (ос. ч). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и БЭ были определены абсорбционным методом с использованием следующих коэффициентов экстинкции: для ДНК тимуса теленка —  $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , для БЭ —  $\varepsilon_{480} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Концентрацию *cis*-DDP получили методом взвешивания, с дальнейшим приготовлением концентрированного раствора. Соответствующие рабочие концентрации *cis*-DDP получили разбавлением исходного концентрированного раствора. Исследования проводились в буфере, содержащем  $10^{-2}$  моль NaClO<sub>4</sub> +  $10^{-3}$  моль NaCl, ионная сила составляла —  $\mu = 0.01 \text{ M Na}^+$ , pH 6.9.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре PUE Unicam-SP8-100 (Англия). Использовали кварцевые кюветы длиной оптического пути 1 см. Плавление ДНК и ДНК-*cis*-DDP-БЭ комплексов осуществлялось абсорбционным методом при длине волны  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Значения поглощений образцов выводились на дисплей компьютера с помощью программы, обработанной В. Элбакяном в среде программирования LabVIEW 7.0. При плавлении комплексов нагрев растворов, помещенных в термостатированные кюветы с герметически закрытыми тефлоновыми пробками, осуществлялся со скоростью 0.25 град/мин с помощью прибора SPX-876 Temperature Programme Controller (Англия). Температура растворов образцов менялась от 45 до 98°C. Параметры плавления комплексов —  $T_m$  и  $\Delta T$  определялись, как описано в [3]. Размер точек соответствует среднему значению 5-6 измерений. Ошибка экспериментов составляла ~ 5%.

Исследования комплексов БЭ с ДНК в широком интервале изменения концентрации лиганда ( $0 < r_b \leq 0.4$ ) выявили, что при значениях  $r_b \leq 0.1$  ( $r_b = \text{БЭ/ДНК}$ )  $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов возрастают (рис. 1). При дальнейшем

увеличении концентрации БЭ  $T_m$  комплексов продолжает возрастать, в то время как  $\Delta T$ , проходя через слабо выраженный максимум ( $0.1 < r_b \leq 0.15$ ), уменьшается. При низких концентрациях основным способом связывания БЭ с ДНК является интеркаляция, что приводит к стабилизации дц-структуры ДНК и увеличению  $T_m$ . Возрастание же  $\Delta T$  комплексов обусловлено тем, что в ходе плавления происходит перераспределение связанных молекул лиганда с расплавленных оц-участков на дц-участки ДНК. При увеличении концентрации БЭ перераспределение прекращается, вследствие чего  $\Delta T$  комплексов выходит на плато и при более высоких концентрациях БЭ начинает уменьшаться. Этот феномен обусловлен тем, что БЭ с ДНК начинает связываться и другими способами [5,14].

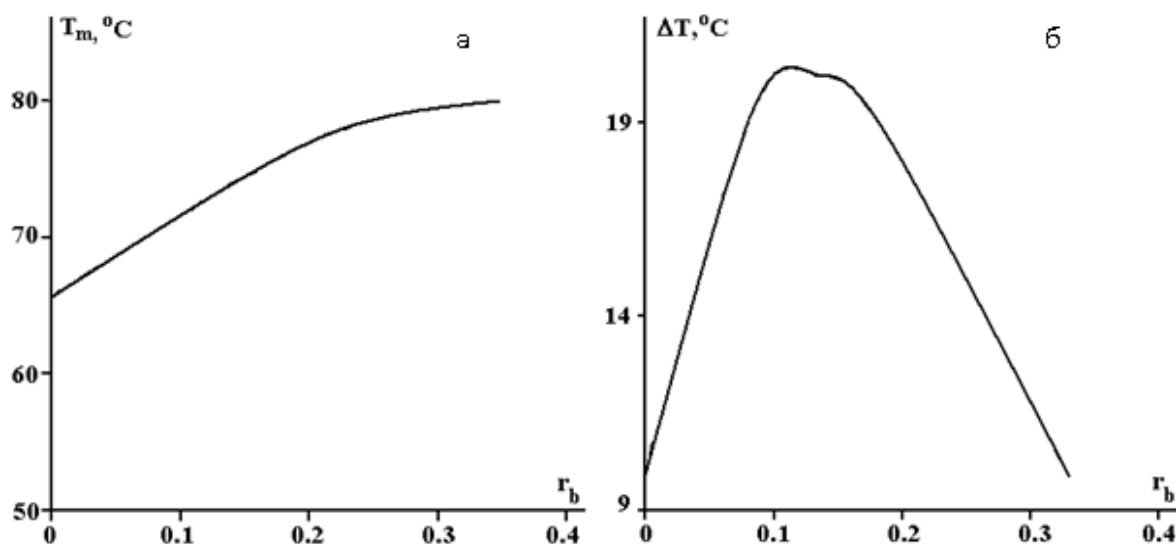


Рис. 1. Кривые зависимости  $T_m$  (а) и  $\Delta T$  (б) от  $r_b$  комплексов БЭ-ДНК, где  $r_b = \text{БЭ}/\text{ДНК}$ .  $\mu 10^{-2} \text{ M Na}^+$ ,  $\text{pH} = 6,9$ .

При этом  $T_m$  комплексов уменьшается в результате двух противоположных эффектов: интеркалированные молекулы стабилизируют, а связанные другими способами (полуинтеркалированные, а также связанные с оц-участками ДНК) молекулы БЭ дестабилизируют дц-структуру ДНК. По достижении равновесия этих эффектов  $\Delta T$  комплексов уменьшается, а возрастание  $T_m$  прекращается. При высоких концентрациях дестабилизирующий эффект БЭ на дц-ДНК превалирует, вследствие чего  $T_m$  комплексов уменьшается, а  $\Delta T$  резко возрастает, поскольку начинается перераспределение связанных молекул БЭ с дц-участков ДНК на оц-участки.

При низких концентрациях  $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов *cis*-DDP – ДНК возрастают по сравнению с параметрами плавления чистой ДНК, как это видно на рис. 1, где представлены кривые зависимости  $T_m$  и  $\Delta T$  от  $-\lg(C)$ , ( $-\lg(C)$  – отрицательный логарифм отношения концентраций *cis*-DDP/ДНК в растворе [11]). В рамках существующих теорий объяснить

это явление невозможно. Было высказано предположение о возможности образования псевдокольцевых структур в ДНК, что в дальнейшем получило обоснование в работе [12]. На основании данных, полученных для комплексов ДНК с *cis*-DDP в широком интервале изменения концентрации последнего, было выявлено, что механизмы взаимодействия этого препарата с ДНК различны, что отражается на  $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов следующим образом (рис. 2, а, б, сплошные линии): 1) в интервале изменения концентрационного соотношения  $10^{-9} \leq C \leq 10^{-8}$  (где  $C = \text{cis-DDP}/\text{ДНК}$ )  $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов значительно увеличиваются по сравнению с  $T_0$  и  $\Delta T_0$  чистой ДНК. В этом интервале изменения  $r_b$  в молекуле ДНК образуются кольцевые структуры; 2) в интервале изменения  $10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$   $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов монотонно уменьшаются, поскольку увеличение числа кольцевых структур приводит к разрыву водородных связей и облегчению плавления комплексов.

В интервале  $C > 10^{-5}$   $T_m$  комплексов резко уменьшается, а  $\Delta T$  увеличивается в результате образования оц- и дц-цепочечных (дц-) разрывов в ДНК с последующим формированием коротких линейных фрагментов ДНК.

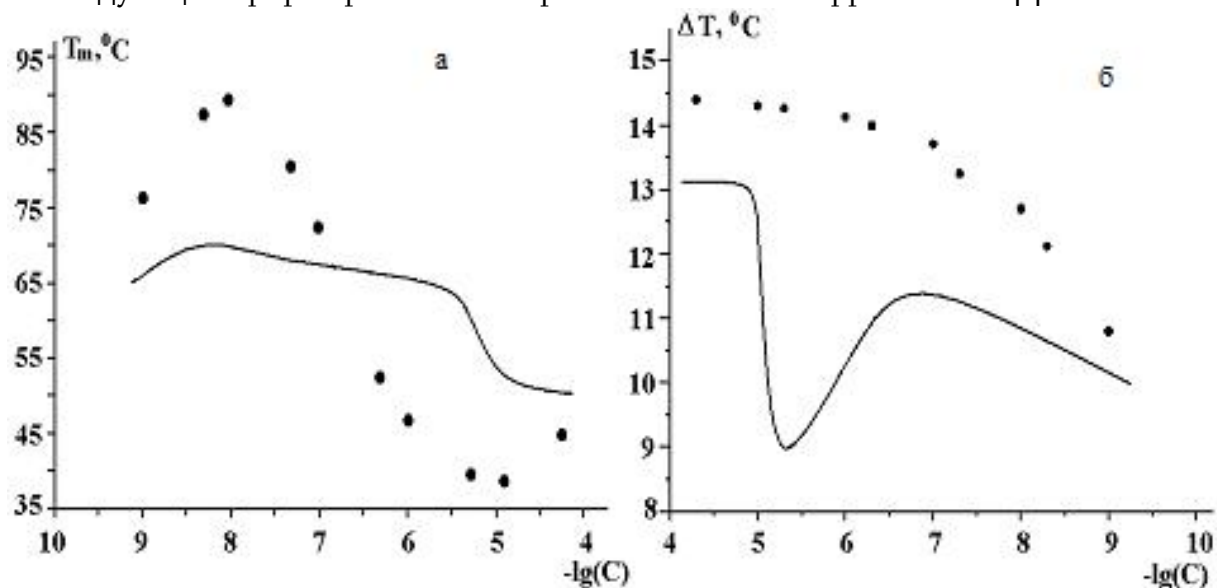


Рис. 2. Кривые зависимости  $T_m$  (а) и  $\Delta T$  (б) от  $-\lg(C)$  комплексов БЭ с *cis*-DDP – ДНК. Сплошная линия соответствует зависимостям  $T_m$  и  $\Delta T$  от  $-\lg(C)$  комплексов *cis*-DDP – ДНК в интервале изменения  $C - 10^{-9} \leq C \leq 10^{-5}$ . Точки соответствуют комплексам БЭ с *cis*-DDP – ДНК в интервале изменения  $0 \leq r_b \leq 0.4$ . Ионная сила раствора  $10^{-2}$  М  $\text{Na}^+$ , рН=6.9.

На рис. 2 приведены также зависимости  $T_m$  (а) и  $\Delta T$  (б) от  $-\lg(C)$  ( $C = \text{cis-DDP}/\text{ДНК}$ ) (точки на соответствующих кривых) при комплексообразовании *cis*-DDP-ДНК с БЭ. Концентрационное соотношение БЭ/ДНК менялось в интервале  $0 \leq r_b \leq 0.4$ . При совместном взаимодействии при низких концентрациях как *cis*-DDP, так и БЭ  $T_m$  и  $\Delta T$  комплексов увеличиваются

намного больше, чем при отдельном связывании, хотя эффект усиления не является простой суммой воздействия этих веществ в отдельности на ДНК. Необходимо отметить, что данные, полученные при комплексообразовании БЭ с *cis*-DDP – ДНК практически не отличались от аналогичных данных, полученных в случае, когда БЭ – ДНК комплексы инкубировались в присутствии *cis*-DDP в течение 48 ч. Это обусловлено тем, что *cis*-DDP ковалентно связывается с ДНК и при инкубации связанные молекулы БЭ практически не препятствуют специфическому связыванию молекул *cis*-DDP с ДНК.

Как видно из рис. 2, при увеличении  $r_b$   $T_m$  комплексов начинает уменьшаться в интервале изменения  $C - 10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$ , при этом понижение  $T_m$  тройной системы ДНК – *cis*-DDP – БЭ намного больше, чем в случае отдельных взаимодействий этих лигандов. Это указывает на то, что под влиянием *cis*-DDP дестабилизирующее влияние БЭ на дц-ДНК усиливается. На это указывает и тот факт, что  $\Delta T$  тройной системы продолжает увеличиваться, несмотря на то, что этот параметр при отдельном связывании БЭ проходит через не очень выраженный максимум (рис. 1, б) при относительно больших концентрациях и начинает уменьшаться. Вероятно, в интервале  $10^{-8} \leq C \leq 10^{-5}$  при комплексообразовании *cis*-DDP с ДНК водородные связи разрываются, не исключаются также оц-разрывы сахаро-фосфатного остова ДНК, что приводит к дестабилизации дц-структуры ДНК. Вследствие этого БЭ предпочтительно связывается с денатурированной ДНК (превалирует дестабилизирующее влияние) и из-за перераспределения молекул БЭ с дц- на оц-участки  $\Delta T$  комплексов увеличивается. При отдельном связывании *cis*-DDP с ДНК в этом интервале изменения  $C$  на кривой зависимости  $\Delta T$  от  $-\lg(C)$  обнаруживается ярко выраженный минимум вследствие облегчения перехода спираль-клубок комплексов (рис. 2, б, сплошная линия). При дальнейшем увеличении  $r_b$  обнаруживается возрастание  $T_m$ . В этом интервале изменения соотношения *cis*-DDP/ДНК образуются короткие линейные фрагменты, вследствие чего  $T_m$  комплексов при отдельном взаимодействии *cis*-DDP с ДНК уменьшается. Поскольку при этом дц-структура фрагментов ДНК восстанавливается, то молекулы БЭ начинают интеркалировать в эти структуры, что приводит к стабилизации дц-ДНК и возрастанию  $T_m$  тройной системы *cis*-DDP – ДНК – БЭ. В этих условиях  $\Delta T$  также увеличивается из-за возрастания  $GC$  гетерогенности указанных фрагментов, однако этот эффект выражен не ярко.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить:

- при низких концентрациях *cis*-DDP и БЭ параметры плавления ДНК меняются в одном и том же направлении, при этом наблюдается взаимное

усиление стабилизирующего влияния этих соединений на дц-структуру ДНК,

- при относительно высоких значениях  $r_b$  наблюдается противоположное влияние этих соединений на  $T_m$  и  $\Delta T$  тройной системы при переходе спираль – клубок ДНК,
- несмотря на то, что cis-DDP образует с ДНК необратимые ковалентные связи, обратимо связывающееся соединение БЭ определенным образом влияет на структуру комплексов cis-DDP – ДНК,
- в определенных условиях эти соединения могут иметь синергетическое, а в других – антагонистическое влияние при совместном взаимодействии с ДНК.

Ереванский государственный университет

**П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, Г. С. Саркисян, С. Г. Арутюнян**

#### **Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК в присутствии cis-DDP**

Изучено плавление комплексов ДНК-cis-DDP с бромистым этидием в широком интервале изменения концентраций обоих лигандов. Показано, что в случае низких концентраций указанных лигандов и их совместном действии температура плавления комплексов –  $T_m$  и интервал плавления –  $\Delta T$  возрастают в еще большей мере, чем при их отдельном связывании, причем величины  $T_m$  и  $\Delta T$  не являются алгебраической суммой величин, соответствующих отдельному связыванию.

**Պ. Ն. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Գ. Ս. Սարգսյան, Ս. Գ. Նարությունյան**

#### **ԴՆԹ-ի հետ բրոմական էթիդիումի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը cis-ԴԴՊ-ի առկայությամբ**

Ուսումնասիրվել է ԴՆԹ – cis-ԴԴՊ-ի հետ բրոմական էթիդիումի կոմպլեքսների հալումը երկու լիզանդների կոնցենտրացիաների փոփոխության լայն միջակայքում: Յույց է արվել, որ նշված լիզանդների ցածր կոնցենտրացիաների եւ համապեղ փոխազդեցության դեպքում կոմպլեքսների հալման ջերմաստիճանը՝  $T_m$ -ը, եւ հալման միջակայքը՝  $\Delta T$ -ն, ավելի մեծ չափով են աճում, քան նրանց առանձին կապման դեպքում, ընդ որում,  $T_m$ -ի եւ  $\Delta T$ -ի արժեքները չեն ներկայացնում առանձին կապման դեպքում սրացված համապարասխան մեծությունների հանրահաշվական գումար:

Study of Ethidium Bromide Interaction with DNA in the Presence of cis-DDP

The melting of Ethidium Bromide with DNA-cis-DDP complexes in a wide interval of change both ligands is carried out. It is revealed, that at the low concentration of both ligands at joint binding with DNA the melting temperature ( $T_m$ ) and width of melting interval ( $\Delta T$ ) of complexes are increased much more, than at separate binding, however, sizes of  $T_m$  as well as  $\Delta T$  are not the algebraic sum of the appropriate values at separate binding.

Литература

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. - Биофизика. 2003. Т. 48. N 4. С. 644-647.
2. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. - Мол. биол.1997. Т. 31. N2. С. 263-273.
3. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. - Мол. биол. 2000. Т. 34. N2. С. 310-315.
4. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суrowая А.Н. - Мол. биол. 1998. Т. 32. С. 855-862.
5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2003. V. 35. N6. P. 527-533.
6. Bongard N., Reedijk J. - J. Inorg. Biochem. 1991. V. 43. P. 428.
7. Eastman A. - Biochemistry. 1985. V. 24. P. 5027.
8. Cicarelli R.B., Solomon H.J., Varshavsky A., Lippard S.J. - Biochemistry. 1985. V. 24. P.7533.
9. Inagaki K., Kindani Y. - Inorg. Chem. Acta, 1985. V. 106. P. 187.
10. Millar O.P., Ho K.M., Aroney H.Y. - Biochemistry. 1988. V. 27. P. 8599.
11. Арутюнян С.Г., Мамасакхлисов Е.Ш., Морозов В.Ф., Далян Е.В., Хачикян Р.Э., Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Ориоли П., Бруни Б. - Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 2. С. 372.
12. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Morozov V.F., Mamasachlissov Eu.Sh., Shahinian M.S., Akhrem A.A., Lando D.Yu., Messori L., Orioli P. - Inorg.Chimica Acta. 1998. V. 275-276, P. 510.
13. Coluccia M., Voccarelli A., Cermelli C., Portolani M., Natile G. - Metal-Based Drugs. 1995. V. 2. N5. P. 249 - 256.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. - Exp. and Mol. Medicine. 2001. V. 33. N4. P. 205-208.